

Un volet de l'histoire des Molécules marquées au CEA : La contribution de la Biologie

Pierre Fromageot

L'idée d'utiliser une marque pour suivre un événement n'est pas nouvelle. Daniel a pisté les Grands Prêtres dans le temple par les traces de cendres laissées par leurs sandales. Plus récemment, Claude Bernard écrivait à Taine "Si je pouvais suivre une molécule d'azote dans le corps d'un chien, je vous raconterais la physiologie". Aussi, dès la découverte de la radioactivité artificielle par Frédéric et Irène Joliot-Curie, le souhait exprimé par Claude Bernard a connu un début de réalisation au Collège de France, dont le cyclotron a permis de préparer de l'iode ^{128}I . Mais c'est avec la démonstration de Fermi que l'on produit une foule de radioéléments artificiels en mettant en oeuvre des neutrons, que les radioéléments artificiels prennent leur essor. Les réacteurs nucléaires que l'on commençait à construire se sont avérés les meilleurs auxiliaires des recherches biologiques, fournissant ^{32}P , ^{35}S et bientôt ^{14}C , à côté des métaux alcalins, du calcium, du chlore et de l'iode radioactifs.

La toute première molécule marquée réalisée en France devait être une hormone, la thyroxine préparée à partir de diiodotyrosine par J. Horeau, R. Courrier, F. Joliot et P. Sue avec l'iode ^{128}I en 1942-1943. Ensuite, sous l'impulsion de J. Guéron, le CEA construisait en 1949 un laboratoire de chimie, dans une casemate du Fort de Châtillon, laboratoire confié à L. Pichat et destiné à la préparation de molécules marquées par ^{14}C et ^{35}S . Tout était à faire. La chimie classique ne prévoyait pas la construction de molécules complexes carbone après carbone, et encore moins en mettant en oeuvre du $^{14}\text{CO}_2$. C'est le mérite de L. Pichat et de ses collaborateurs d'avoir réalisé des progrès considérables dans une chimie nouvelle, permettant, avec de très petites quantités d'introduire un groupe méthyle, un carboxyle, un aldéhyde ou un noyau benzénique, dans une série de composés et de les marquer par le ^{14}C de cette façon.

Le CEA, poursuivant son développement, perçu l'importance à la fois des études approfondies sur l'effet biologique des radiations et des recherches sur ce que les isotopes radioactifs et les molécules marquées pouvaient apporter à la Bio-

logie. Les deux volets de ce diptyque devaient se conforter, l'un contribuant à définir ce que sont les processus normaux dont l'autre examinait les perturbations. Cette nouvelle orientation, voulue par F. Perrin, Haut-Commissaire, allait conduire à la création du Service de Biologie, que J. Coursaget devait développer pendant 30 ans et apporter à la préparation de molécules marquées une vigoureuse stimulation.

L'utilisation d'enzymes purifiées

Les études du métabolisme du soufre dans l'embryon d'oiseau, que j'avais entreprises avec F. Chapeville puis avec A. Sentenac, montraient, non seulement que l'embryon disposait d'un système de réduction des ions sulfate en ions sulfite d'une extrême efficacité, mais aussi d'une cystéinylase, labilisant sans la couper la liaison C-S' de la cystéine. En présence d'un nucléophile, HS-, HSO₃, on observe un déplacement du soufre organique et son remplacement par le nucléophile présente. Cette réaction a permis de préparer de la L-cystéine et de la taurine marquées par ^{35}S , substances dont nous avions besoin. Le précurseur minéral radioactif fourni par les chimistes des piles est l'acide sulfurique ^{35}S . J'ai dû adapter en lisant le traité de chimie de Berzélius, une méthode simple de réduction de l'acide sulfurique en acide sulfureux puis en sulfure. Plus tard, en remplaçant la cystéine par la phosphoserine et en purifiant l'enzyme, nous parvenions à ces radioactivités spécifiques très élevées et bien supérieures à celles des chimistes, tout en préservant le stéréo-isomère naturel. Très vite, des biochimistes, collègues français ou étrangers, nous demandèrent des échantillons, ce qui nous fit accroître les quantités préparées. La technique est toujours en usage, mais l'enzyme est isolée de la levure qui remplace le sac vitellin de l'embryon d'oiseau.

Remarquons que cet enzyme disparaît de l'embryon avec le sac vitellin, et ce n'est que dans le monde clos de l'oeuf dans sa coquille, qu'il apparaît.

Pourquoi en est-il ainsi ? C'est une question qui nous a fort préoccupé. Si,

aujourd'hui le lecteur dira sans peine ce qu'il serait pour répondre, en 1956-1958 nous étions perplexes et avons voulu examiner comparativement et de façon globale, le métabolisme et ses variations dans le sac vitellin et dans l'embryon né. Une extrême sensibilité nous paraissant nécessaire, nous avons dû nous forger nos outils, car, les acides aminés et les sucres disponibles, marqués par ^{14}C sur un carbone, n'atteignaient pas les radioactivités spécifiques requises, sans compter les difficultés provenant de la présence des isomères optiques.

Les chlorelles à l'engrais

Aussi avons-nous entrepris en toute innocence de cultiver des chlorelles dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ avec l'espoir de les voir se multiplier et synthétiser des protéines uniformément marquées qu'il nous suffirait d'isoler, d'hydrolyser pour obtenir des acides aminés aussi radioactifs qu'il est possible. Les premiers résultats furent très décevants. Le nombre de cellules reste au mieux constant. Ce qui change après quelques heures de présence dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$, c'est la distribution des tailles. Toutes les petites cellules ont disparu. Bientôt, nous nous apercevons qu'il n'y a aucune division cellulaire. Les petites cellules apportées par l'inoculum ne font que grandir, s'arrêtent et dépérissent. Pour limiter la dilution des protéines néosynthétisées, nous devions synchroniser les cultures de chlorelles et, lorsqu'elles viennent toutes de se diviser, les changer d'atmosphère pour offrir au $^{14}\text{CO}_2$ le maximum de cellules filles. Après une journée à la lumière, la taille maximale étant atteinte, nous commençons la partie extractive, après élimination par le chloroforme de tout ce qui voulait bien se dissoudre comme pigments et lipides, par une hydrolyse enzymatique des protéines totales avec le mélange d'enzymes excrétés par le *Streptomyces griseus*.

Lors de l'isolement des acides aminés, la déception de constater que beaucoup étaient absents, comme la proline, l'arginine et que les rendements étaient faibles, ont conduit à séparer les produits de l'hydrolyse pour voir que 60% des liaisons

peptidiques n'étaient pas coupées et restaient résistantes à toutes sortes d'enzymes protéolytiques. Ce n'est que bien plus tard que nous avons été voir en détail la nature des peptides résistants, et c'est l'oeuvre de A. Machard mais, dans l'immédiat, ce qu'il me fallait, c'étaient les acides aminés. Une hydrolyse acide complémentaire résolut la question.

Une seconde surprise de cette époque fut de réaliser combien l'eau distillée, les sels, phosphates, nitrates, etc., contiennent de $^{12}\text{CO}_2$ qui vient diluer le $^{14}\text{CO}_2$ mis en oeuvre. Nous avons mis des mois pour surmonter cette difficulté et la radioactivité spécifique des produits isolés fit un bond.

Là aussi, nous étions les premiers utilisateurs pour les raisons dites mais, très vite, les amateurs d'acides aminés uniformément marqués se firent insistants. Ils recherchaient aussi du glucose et du saccharose, comme nous.

La feuille de tabac

Il suffit de regarder une chlorelle pour voir qu'elle contient de l'amidon. Dans un premier temps, j'ai pourtant utilisé un autre organisme, plus facile peut-être, la feuille de tabac, réputée ne contenir que très peu de sucres libres. Aussi, après une nuit à l'obscurité, pouvait-on l'en débarrasser presque complètement, et il suffisait d'exposer la feuille 30 minutes à la lumière sous $^{14}\text{CO}_2$ pour récolter suffisamment dans l'extraît aqueux, du glucose et de saccharose ^{14}C de radioactivité spécifique élevée.

On comprendra que ces travaux, indispensables à l'activité du laboratoire, n'en étaient pas la raison d'être et, menaçant de prendre de l'ampleur, me posaient un problème de fond.

La création d'un laboratoire spécifique

C'est d'un épiphénomène inattendu qu'est venue la solution, en l'occurrence la visite de Mr. N. Kroutchev à Paris en 1958. Ses conseillers et ceux de notre gouvernement signèrent un protocole de coopération dans le domaine de la préparation de molécules marquées par voie biologique, entre le CEA et son homologue soviétique. Du jour au lendemain, j'étais chargé de construire le laboratoire consacré à cette tâche et recevais des locaux et du personnel. Je devais faire plus et mieux dans un cadre officiel. Bien des recherches étaient nécessaires pour maîtriser les conditions d'obtention des molé-

cules marquées d'intérêt biologique : améliorer le matériel biologique initial, perfectionner des méthodes préparatives et analytiques, assurer des conditions de confinement rigoureuses, établir des accords avec le laboratoire dirigé par L. Pichat pour l'acheminement vers l'extérieur de notre production.

Un nouveau collaborateur : La Spirulline

J'ai dit les limites de la chlorelle. Nous avons essayé bien d'autres végétaux unicellulaires, mais sans pouvoir observer de multiplication. Par pur hasard, j'apprends que l'on a trouvé des cyanophycées fossiles très voisines de celles qui vivent aujourd'hui et, à l'époque des fossiles, la terre devait être très radioactive, et ces bactéries particulièrement équipées pour résister. Comme notre Administrateur Général, Mr. A. Giraud était antérieurement Directeur de L'Institut Français du Pétrole, j'ai pu obtenir de cet Institut une souche de cyanophycées filamenteuses, la *Spirulina maxima*, qui pousse dans des lacs très salés du Tchad et, ce qui est mieux, avec un pH optimum de 10. Pour absorber du CO_2 , c'est un avantage, comme le sont aussi les conditions assez peu communes de salinité, lorsqu'on pense réaliser de grosses cultures. Mais sa propriété essentielle que nous avions présentée, est sa capacité à se multiplier en présence de $^{14}\text{CO}_2$ pur avec la même vitesse qu'en présence de CO_2 ordinaire. Nous tenions là une solution presque parfaite de préparation d'acides aminés uniformément marqués par le ^{14}C , mais aussi de sucres, par hydrolyse des polysaccharides présents et même de nucléotides. La souche s'arrête de croître lorsque le CO_2 disponible est épuisé.

Comme nous changions d'échelle, nous avons construit une enceinte adaptée aux techniques et aux quantités mises en oeuvre, de l'ordre de 6 curies et ^{14}C par culture, en pensant à éviter les contaminations de toute nature, tout en restant commode pour le personnel. Pour y parvenir, nous avons réalisé des modèles où l'on procédait aux expérimentations en vraie grandeur mais avec des composants non radioactifs. Les techniques de séparation ont été revues, étape par étape, pour gagner du temps et être capables de s'accommoder de 20 mmoles à 200 mmoles de chacun des constituants. La filtration sur lamis moléculaire de l'hydrolysât brut, la séparation des acides aminés en classes, aromatiques, basiques, acides et neutres, la transformation de ces derniers

en complexes métalliques avec le cuivre et le nickel, la séparation dans chacune des classes des constituants par des chromatographies dans des solvants volatils. C'est H. Maice-Hisser, puis F. Sala, puis R. Mermet-Bouvier et A. Machard qui ont pris à bras le corps toutes les difficultés, les ont résolues et sont parvenus à des solutions satisfaisantes, obtenant avec de bons rendements des produits d'une grande pureté, mesurée, parce que les impuretés d'origine, étant radioactives, se détectaient et se quantifiaient très facilement. Ce qui est moins commode à écarter, ce sont les produits de dégradation dus à la radiolyse. Ceux qui proviennent directement de la désintégration de ^{14}C ne peuvent être évités, mais ceux qui proviennent de l'effet de rayonnement sur les molécules voisines et le solvant peuvent être fortement réduits, par exemple, en conservant les acides aminés absorbés sur du papier filtre à la température de l'azote liquide et en éluant et procédant à une rechromatographie, juste avant l'utilisation. Les radioactivités spécifiques, homogènes, se trouvaient très proches de celle du $^{14}\text{CO}_2$ utilisé, soit 51 mc par milliatome de carbone.

Tout cela arrivait à maturité à un moment de grand besoin. Nierenberg montrait en 1961 que le polyU dirigeait la synthèse de polyphénylalanine, et l'intérêt pour la détermination du code génétique prenait son essor et mobilisait bien des chercheurs. Nous étions prêts à faire face et le CEA a fourni dans le monde entier les acides aminés uniformément marqués par le ^{14}C . Ce que je veux souligner ici, c'est l'enthousiasme, l'esprit offensif avec lequel mes collaborateurs ont abordé les difficultés, sûrs que tout pouvait être résolu. C'est cette attitude qui nous protégeait contre des accidents. Aucune culture sous $^{14}\text{CO}_2$ n'a été laissée seule pendant la nuit. Nous nous sommes relayés auprès d'elle, l'un après l'autre, et nous avons bien fait, car qui peut dire qu'un appareil de régulation ou de contrôle tombe jamais en panne ? Et puis, pendant ces heures de veille ont évoqué l'avenir sous forme de nouveaux projets. C'est ainsi que le *Synechococcus*, autre cyanophycée, a remplacé la spirulline, parce que cette bactérie est accessible à la génétique. J. Labarre a isolé des mutants déprimés dans la régulation de la synthèse d'un acide aminé, par exemple la phénylalanine. Un tel mutant devient un organisme prodigieux d'efficacité, à la lumière en présence de $^{14}\text{CO}_2$ pour la préparation d'un acide aminé uniformément marqué l'état presque pur. Il est même possi-

d'utiliser le $^{11}\text{CO}_2$ malgré sa période de 20 minutes, tant est rapide l'ensemble du procédé.

Les cyanophycées peuvent-elles exprimer des gènes étrangers ou synthétiques ? C'est ce que R. Chauvat a entrepris d'examiner avec la souche qu'il maîtrise bien. L'intérêt est de pouvoir marquer une protéine sans la soumettre à des traitements susceptibles d'en altérer la conformation et, à partir du précurseur le moins coûteux possible le $^{14}\text{CO}_2$. En attendant, un marquage au ^{14}C d'une protéine est possible en introduisant dans *E. coli* le gène correspondant à un acide aminé marqué, comme le fait aujourd'hui J. Labarre avec succès.

Tritiation de polypeptides hormonaux

Alors que progressait la préparation d'acides aminés, de sucres et de triphosphonucleotides radioactifs et de quelques autres substances isolées des cyanophycées, une soixantaine au total, de nouvelles préoccupations se faisaient jour. Au CBA même, F. Morel étudiait la perméabilité des cellules rénales et le mode d'action de l'ocytocine et de la vasopressine, souhaitant visualiser les cellules cibles de ces hormones et définir le concept de récepteur en termes moléculaires. Pouvions-nous lui apporter l'appui d'hormones radioactives ? Le terme radioactif n'a de sens que si l'on précise la radioactivité spécifique. On peut, sur la base de quelques hypothèses simples, estimer un ordre de grandeur de la radioactivité spécifique nécessaire pour détecter, par exemple, 10^{13} à 10^{14} molécules grammes d'hormone par cellule. On se rend compte qu'il faut atteindre des radioactivités spécifiques supérieures à 10 curies par millimole. Seule la présence d'un ou de deux atomes de tritium pouvait conférer à la molécule la radioactivité spécifique nécessaire (1 milliatome de ^3H correspond à 30 curies). C'était là un nouveau défi qui méritait d'autant plus cher que j'avais isolé et caractérisé vingt ans auparavant la vasopressine.

D'abord, nous avons essayé en bombardant un peptide modèle avec des ions de radicaux tritium produits par des méthodes physiques. C'étaient des variantes d'une technique de tritiation préconisée par Wilzbach, consistant à exposer une substance à du gaz tritium pendant quelques jours.

C'était une fausse piste pour au moins deux raisons : l'une réside dans le mécanisme même de la réaction. C'est la

sion d'une espèce activée du tritium avec un atome d'hydrogène qui est supposée l'arracher, la place laissée libre réagissant avec un ion ou un radical tritium. Or, il se trouve que bien des liaisons C-C ont une énergie égale ou inférieure à celle de liaisons C-H, et les événements les plus fréquents sont des coupures de la molécule étudiée, ses fragments réagissant avec le tritium pour fournir des composés hautement radioactifs. La seconde raison qui rend cette approche de la tritiation inefficace est que si tout se passait comme on le souhaite, la radioactivité spécifique de la molécule étudiée, nulle en temps zéro, devrait croître lentement, parce diluée par la molécule mère. On se trouve finalement avec en main un mélange d'une extrême complexité, réticulé à cause des réactions radicalaires et dont on ne peut plus rien extraire d'intact.

Ce que nous voulions, c'était pouvoir tritier un peptide sans dilution par la molécule originale.

C'est J. Nunez qui nous a montré la voie quand il a préparé de la tyrosine tritiée en déshalogénant de l'iodotyrosine en présence de gaz tritium et de noir de platine. Pouvait-on appliquer cette méthode à un peptide contenant une liaison disulfure comme l'ocytocine ? Fixer un ou deux atomes d'iode sur un résidu tyrosine de l'ocytocine en utilisant l'iode I^0 s'accompagne de l'oxydation du pont disulfure en acide sulfénique et sulfonique. C'est un échec qui nous a incité à entreprendre l'examen *per se* de l'iodation de composés aromatiques en présence de cystine et/ou de méthionine, dans l'espoir de trouver des conditions qui préserveraient les liaisons sensibles. C'est une préoccupation qui s'accordait bien avec les travaux de radiobiologie menés par des laboratoires voisins, cherchant à protéger les ponts disulfure de protéines irradiées en solution.

A cet effet, nous avons étudié les mécanismes d'iodation et leur cinétique, observant que l'espèce I^+ réagit incomparablement plus vite que I^0 , si vite même sur les noyaux tyrosyle et histidyle que les atomes de soufre réduits de la cystine ou de la méthionine ne sont pas affectés, tant que I^+ n'est pas en excès.

Dès lors, nous pouvions espérer halogéner un peptide porteur d'une tyrosine ou/et d'une histidine. Mais il y a mieux encore. L'iodation d'un de ces résidus change le pK de leur groupe ionisable aromatique, l'abaissant de deux unités par atome d'iode fixé. En outre, leur hydrophobicité est très augmentée. On peut donc espérer séparer un peptide iodé de la

molécule parentale et, effectivement, c'est une opération très facile, quelquefois trop facile, le peptide iodé devenant tellement hydrophobe qu'il tend à s'attacher à tout, même aux parois. Le lecteur voit maintenant immédiatement la démarche : si R-II est le peptide à tritier, l'iodation, par I^+ , donnera un mélange R-II + R-I, dont on isole R-I pur. Ensuite, en s'y prenant bien, en présence de noir de platine et sous pression réduite de gaz tritium, à pH voisin de 5, on déshalogène sans réduire le soufre, et se retrouve avec R-I + R- ^3H . On en isole le peptide cherché sans dilution isotopique par la molécule d'origine. Cette dernière étape est très importante, car la rupture de la liaison R-I conduit en un premier temps au radical R $^{\bullet}$ et, en un second temps à R- ^3H , mais aussi à bien autre chose, dont des polymères. Le rendement en est affecté. La température, la manière de préparer le catalyseur jouent un rôle et nous avons examiné ces facteurs, peu à peu, au fil des ans. Chaque peptide est d'ailleurs un cas particulier.

Il est opportun de remarquer ici que les peptides sont généralement solubles dans l'eau, non dans les solvants organiques. C'est donc en solution aqueuse que nous devons opérer. Or 1 ml d'eau, c'est 1/18ème de molécule d'hydrogène sous forme de protons. Si je mets en oeuvre 15 curies de tritium, soit 1/4 de millimole, dans ce volume d'eau, je m'expose à une dilution d'un facteur voisin de 200, car le platine réduit et saturé de tritium catalyse aussi l'échange entre le tritium et les protons du solvant. Pour éviter cette dilution, il faut déshalogéner beaucoup plus vite qu'échanger. C'est une course que nous avons gagnée. Il demeure qu'un échange n'est pas évitable et la molécule tritiée doit être débarrassée des hydrogènes labiles, ceux susceptibles de s'ioniser.

Alors que nous n'en étions encore qu'au début de cette histoire, j'ai dû faire face à des rafales de critiques qui prédisaient l'échec certain, l'impossibilité absolue de préparer des peptides porteurs, même d'un seul atome de ^3H , que la radioactivité présente détruirait tout la structure, que c'était gaspiller l'argent public que de persévérer.

Lorsqu'en 1970, le premier échantillon d'ocytocine tritiée, de 30 curies par millimole, fut prêt et que F. Morel, comparant son activité biologique avec celle de l'ocytocine normale, la trouvait indistinguable, le pari était tenu. C'était aussi le départ d'une série d'études coopératives entre le CBA et les meilleurs laboratoires d'endocrinologie, qui souhaitaient identi-

ner, quantifier, caractériser et isoler les récepteurs des familles d'hormones polypeptidiques. P. Meyer proposait immédiatement après de tritier l'angiotensine II, ce qui fut fait avec succès la même année, et nous atteignons pour ce second essai 56 curies par millimole, tout en conservant l'intégralité des propriétés biologiques. Si je parais insister, c'est qu'à l'époque, un tel résultat n'était pas si évident. Les critiques cessèrent d'ailleurs instantanément et, toute honte bue, les plus virulents détracteurs vinrent solliciter la tritiation de leur molécule préférée.

En 1971, c'est une protéine, une neurotoxine comportant quatre ponts disulfure qu'A. Menez allait tritier, en collaboration avec J.P. Changeux, lequel devait isoler peu après le récepteur de l'acétylcholine, en se fondant sur la très forte affinité de la toxine pour le récepteur.

La petite équipe qui s'est ainsi constituée avec J.L. Morgat, a été particulièrement active et a tritié la quasi totalité des peptides biologiquement actifs étudiés de 1970 à 1990 dans le monde. Elle a vérifié, à de nombreuses reprises par examen direct avec l'appareil de RMN équipé pour la détection de tritium présent au laboratoire de L. Pichat, la position du marquage sur la molécule. Ce souci de précision, comme celui de pureté de la molécule finale, ont d'ailleurs conduit J.L. Morgat à construire un dispositif original permettant d'injecter ou de retirer des quantités connues de gaz tritium dans un micro-réacteur spécial. On sait bien que manipuler un gaz suppose un banc à vide, des pompes et des joints. Or le tritium altère, craque les graisses à vide, formant des produits gazeux, radioactifs et hautement réactifs avec les peptides présents. Les pompes se sont avérées nocives aussi, et il a fallu se débarrasser de tout ce qui n'était pas métallique, hormis le téflon. L'appareil de J.L. Morgat a, non seulement permis la tritiation au laboratoire dans d'excellentes conditions, mais a été vendu et exporté dans bien des laboratoires désireux d'entreprendre une démarche analogue.

Nous aurions souhaité que les chimistes préparent d'avance les peptides importants sous forme de diodopeptides que nous n'aurions plus eu qu'à deshalogéner en présence de tritium. Pendant longtemps, la chimie de la déprotection des acides aminés n'était pas compatible avec cette solution. Par contre, nous avons obtenu la synthèse de peptides porteurs de déhydroaminoacides. Le premier a été un analogue de l'hormone de libération de l'hormone thyroïdienne, le TRII, qui com-

portait à la fois de la déhydroproline et de l'histidine. La tritiation a réduit le résidu déhydroprolyle et deshalogéné le résidu diiodohistidyle, conduisant à une radioactivité spécifique voisine de 120 curies par millimole. Madame Tixier-Vidal, avec ce matériel, a établi pour la première fois la pénétration d'une hormone polypeptidique à travers la membrane pour se retrouver dans une cellule cible, intacte, comme son isolement a permis de le prouver sans ambiguïté. Le second peptide, synthétisé par E. Briens et C. Blanot, avec introduction d'une déhydrolysine, est le facteur thymique isolé par J.F. Bach, facteur que nous avons réduit au laboratoire, en 1978. C'est un domaine qui ne peut que se développer.

Les peptides deshydrogénases

Il existe dans la nature des peptides et des protéines qui possèdent des doubles liaisons, sous forme de déhydroalanine, de déhydroproline et bien d'autres doubles liaisons qui semblent bien avoir été introduites après formation de la liaison peptidique. Il existe aussi des colorants, la violacéine issue de *Bacillus violaceum*, par exemple, si populaire puisqu'elle sert à teindre le coton des jeans, dont la première étape de biosynthèse est une déshydrogénation du tryptophane. Cet enzyme que j'ai commencé à isoler et qui a été purifié par R. Genet, crée une double liaison entre les carbones α et β d'un résidu tryptophane dont le groupe NH est substitué ou engagé dans une liaison peptidique. La double liaison ainsi créée provoque l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption dans l'UV. Les recherches sont encore en cours, mais il est clair que l'on pourra disposer là de nouveaux outils pour introduire une double liaison dans une structure peptidique et la préparer à réagir dans des conditions douces avec des catalyseurs d'hydrogénation, élargissant le domaine des tritiations.

Les isotopes stables et la RMN

La possibilité de préparer des hormones polypeptidiques marquées au tritium a permis de se demander, en termes expérimentaux si l'on pouvait définir ce qu'est un récepteur et ses exigences structurales en matières de ligands. C'est une question que nous nous sommes posée au laboratoire et, de là, date notre intérêt pour la synthèse peptidique et les études conformationnelles en solution. Parmi les tech-

niques qui paraissent essentielles, la RMN à haut champ ouvrait des possibilités inconnues jusqu'alors. Pour persuader ma Direction de nous confier un appareil de RMN, il nous fallait montrer ce que nous savions faire avec les appareils existant ailleurs. Les études entreprises avec S. Fermandjian de l'angiotensine II, comparant les séquences primaires, les structures et l'affinité d'une série d'analogues pour le même récepteur, études réalisées en coopération avec P. Meyer, S. Régoli et C. Bumpus, ont paru convaincantes. Celles que développait A. Menez, à propos des neurotoxines, ne l'étaient pas moins. C'est ainsi que J. Horowitz, notre Directeur, fit pour nous en 1970, l'acquisition d'un CAMECA 250 MHz qui venait, pour un temps combler nos vœux. Très vite, nous nous sommes heurtés aux limites inhérentes à la RMN du proton et il m'est apparu qu'il fallait absolument disposer de l'aide que pouvaient apporter certains isotopes stables, soit pour simplifier un spectre, soit pour accéder à des mesures nouvelles. C'était dire qu'un nouveau programme devait être mis sur pied, celui de préparer des acides aminés enrichis en ^2H , ^{13}C , ^{15}N .

Il n'était pas question de pouvoir bénéficier de bras supplémentaires, mais, grâce à l'énergie de tous, nous avons accru la productivité de l'équipe préparant les acides aminés ^{14}C , au point de pouvoir aborder les cultures en présence d'isotopes stables sans nuire à l'ensemble existant.

En 1971, nous acquérons le CO_2Ba à 90% de ^{13}C , aux États-Unis, le NO_3K à 95% de ^{15}N en URSS et $^2\text{H}_2\text{O}$ pur au CEA, et commençons à cultiver des Spirullines dans des volumes de 20 litres. En effet, les quantités requises de chacun des acides aminés, voisines de 10 à 20 grammes, supposaient un complet réaménagement des techniques séparatives. Comme nous n'avions pas de centrifugeuse de grande capacité, la Spirulline était idéale, parce que sédimentant spontanément. En 1972, nous avons le plaisir de voir les premiers acides aminés uniformément enrichis en ^{13}C , sous forme cristallisée, blancs et bien propres, tant sur le plan chimique qu'optique, comme la RMN pouvait l'établir. En 1974, nous en donnons les caractéristiques RMN essentielles et P. Cohen, au laboratoire, abordait l'étude expérimentale de l'association entre l'ocytocine ^{13}C qu'il avait synthétisée et la neurophysine. Le mouvement ainsi lancé ne devait plus s'arrêter et l'on se rend bien compte aujourd'hui, combien précieux sont ces isotopes stables, qui permettent de soumettre à l'analyse RMN

des protéines qui, hier, étaient encore inaccessibles à de telles études.

Faire face à ces nouveaux objectifs et trouver des solutions pour chaque cas particulier, supposent une intégration de moyens de natures très différentes : non seulement obtenir des acides aminés enrichis en un ou plusieurs isotopes stables, en des quantités inégales jusqu'alors, mais être capable de les placer en des endroits stratégiques dans les protéines étudiées, sont les conditions de réussite. C'est devoir associer à une familiarité avec les méthodes analytiques et préparatives les plus raffinées, une expérience de première main en génétique moléculaire. Est-ce possible ? Oui, si cet effort fait partie d'un ensemble de recherches actives. Ce sont P.N. Lirsac et A. Menez qui réalisent aujourd'hui cette combinaison si précieuse.

Conclusion

La description que je viens de faire ne recouvre que les préoccupations, les travaux, les choix auxquels j'ai été mêlé et n'évoque que succinctement les résultats obtenus. D'autres domaines, par exemple, celui des isotopes à vie brève, émetteurs de positons, si prodigieux par le regard qu'ils permettent de porter à l'intérieur d'un organisme supérieur, ont été décrits ailleurs par ceux qui le connaissent.

Ce qui me paraît important à souligner, c'est l'intrication constante entre les pro-

jets de recherche et les préoccupations préparatives, les secondes rendant possibles les premières, celles-là suggérant de nouveaux développements et la création de nouveaux outils. C'est bien parce que le laboratoire participait, à part entière, aux recherches fondamentales de son temps, que nous avons pu être prêts au bon moment pour apporter à la communauté scientifique internationale, les molécules marquées nécessaires.

L'accroissement explosif des recherches biologiques donne aux marquages de molécules un rôle toujours grandissant, en même temps qu'il se diversifie et s'adapte aux problèmes à résoudre. L'étiquette utilisée n'est soumise qu'à une exigence, celle de ne pas modifier de façon perceptible le comportement de la molécule marquée dans le système étudié. Ce qui est donc acceptable dans un cas peut ne pas l'être dans un autre.

On voit s'ouvrir là bien des possibilités nouvelles pour l'étude demain des cinétiques au sein des cellules et des facteurs qui en contrôlent les vitesses respectives. Les routes métaboliques de nos manuels de biochimie doivent être complétées par les flux des substances qui les empruntent. Ce sont là des mondes presque vierges qu'il reste à explorer, comme on l'a fait pour certains "compartiments". De nouvelles étiquettes sont nécessaires et de nouveaux outils aussi, mais on voit bien qu'une nouvelle physiologie et, par conséquence, qu'une nouvelle pathologie,

prennent peu à peu forme.

Outre ces perspectives, on voit se développer, depuis les travaux de Benson et Yallow, un vaste domaine d'identification et de dosage de substances importantes, qui met en jeu des substances marquées et des macromolécules possédant des propriétés de liaisons spécifiques. Ce n'est pas le lieu d'en discuter ici, sauf pour dire que les progrès à faire sont énormes et l'urgence grande, tant dans les marquages proprement dits, que dans l'automatisation des mesures. Pourquoi ne pas voir aussi que le marquage d'une molécule peut servir, non seulement à repérer cette molécule, mais aussi à l'apporter vers une cible. Le marquage devient un étiquetage au sens de la poste, une adresse, servant à diriger la molécule vers sa cible. Ce marquage-là peut être vu de bien des façons et conduira à de nouvelles formes de thérapeutique si la molécule a des propriétés correctives que l'étiquette rend spécifiques.

Les laboratoires de CEA ont acquis dans ces domaines en évolution rapide une expérience et un savoir faire qui permettent de dire que demain, comme hier, ils contribueront au développement de la biologie, comme l'avaient souhaité les créateurs et animateurs les plus prestigieux du CEA, F. et I. Joliot-Curie, R. Perrin, J. Teillac.